

中国明对虾肌肉组织蛋白质双向电泳技术体系的建立

刘志远¹, 励建荣^{2*}, 李学鹏², 李婷婷³, 王彦波¹,
黄 和⁴, 陈华健⁵, 陆维克⁶

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310012;

2. 渤海大学化学化工与食品安全学院, 食品科学研究院, 辽宁 锦州 121013;

3. 大连民族学院生命科学学院, 辽宁 大连 116600;

4. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088;

5. 湛江国联水产开发股份有限公司, 广东 湛江 524022;

6. 杭州博拓生物技术有限公司, 浙江 杭州 311121)

摘要: 为了探索并建立中国明对虾的肌肉蛋白双向电泳体系, 实验将中国明对虾的肌肉组织溶解处理后, 通过固相 pH 梯度胶条等电聚焦、SDS-PAGE 垂直电泳对蛋白质进行分离, 对不同的裂解液配方、IPG 胶条的 pH 范围及其长度、等电聚焦程序、上样量等进行了优化, 并分别利用银染和考染方法进行染色, 应用 PDQuest 软件对图谱进行了初步分析。结果显示, 中国明对虾肌肉蛋白的等电点主要位于 4~7 之间, 裂解液中添加硫脲、CHAPS、DTT 等, 可以增加对虾肌肉蛋白的提取率; 采用 17 cm, pH 4~7 的中型 IPG 胶条, 主动水化上样 120 μ g, 适当延长除盐时间和等电聚焦时间, 搭建盐桥, 采用浓度为 12.5% 的二向分离胶和硝酸银染色, 能有效提高双向电泳(2-DE)图谱中蛋白点的分离度和分辨率; 建立的中国明对虾肌肉蛋白双向电泳体系具有良好的重复性和稳定性。

关键词: 中国明对虾; 肌肉蛋白质; 双向电泳; 蛋白质组学

中图分类号: S 917

文献标志码: A

蛋白质组(Proteome)是由 Wilkins 等^[1]于 1994 年首次提出, 并定义为“由基因组所表达的全部蛋白质”。近年来, 蛋白组学技术发展迅速, 已有望成为用来解决生命科学领域中诸多问题, 包括食品品质与安全等食品科学问题的有力工具^[2]。目前, 蛋白质组学技术在水产品研究中的应用还较少, 尚缺乏系统性, 总体还处于起步阶段^[3]。黄冰心等^[4]提取中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的血浆蛋白用 SDS-PAGE 进行分离, 利用液相色谱-串联质谱系统进行质谱分析, 鉴定了 66 个中国明对虾血浆蛋白质; 秦兆宇等^[5]初步建立了中国明对虾肝胰腺蛋白双向电泳技术, 探索了白斑综合征中国明对虾肝胰腺差异蛋白质组学研究; 田美等^[6]建立了凡纳滨

对虾(*Litopenaeus vannamei*)肌肉组织双向电泳技术; 项秀平等^[7]采用建立的双向电泳技术比较了凡纳滨对虾、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的肌肉蛋白差异; Zhang 等^[8]从中国明对虾的淋巴组织角度对其感染鳃弧菌后进行了蛋白变化分析, 但总体上目前国内外关于中国明对虾肌肉蛋白质组的研究报道较少。

双向电泳技术(2-DE)是蛋白质组学研究的首要条件和关键技术。本研究通过对中国明对虾肌肉样品双向凝胶电泳的几个关键环节的优化, 建立了一种适合于有效分离中国明对虾肌肉蛋白的双向凝胶电泳技术方案, 得到了比较理想的双向凝胶电泳图谱, 为进一步探索中国明对虾肌肉

收稿日期: 2012-04-08 修回日期: 2012-09-12

资助项目: 国家“十二五”科技支撑计划(2012BAD29B06); 浙江省杰出青年科学基金项目(R3110345); 辽宁省食品安全重点实验室暨辽宁省高校重大科技平台开放课题(LNSAKF2011029)

通信作者: 励建荣, E-mail: lijr6491@yahoo.com.cn

<http://www.scxuebao.cn>

品质变化机制等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲜活中国明对虾购于杭州市文二路农贸市场,平均体长 12.5 cm,体质量 11.5 g,装于氧气袋中带回实验室,用碎冰致死,并用双蒸水清洗两次。去头、壳、肠线,将虾仁保存在 -80°C 超低温冰箱中备用。

1.2 试剂与仪器

IPG 干胶条、Bio-Lyte、二硫苏糖醇 (DTT)、CHAPS、四甲基乙二胺 (TEMED)、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠 (SDS)、三羟甲基氨基甲烷、琼脂糖、超纯脲 (Ultra Urea)、丙烯酰胺、碘乙酰胺、过硫酸铵、甘氨酸等,均为生化试剂,购于美国 Bio-Rad 公司;其他试剂均使用国产分析纯试剂。所有溶液均用 Milli-Q 水配制。等电聚焦电泳仪、垂直板电泳仪、GS800 高分辨专业扫描仪,购于美国 Bio-Rad 公司;台式冷冻高速离心机、超低温冰箱,购于美国 Thermo Scientific 公司。

1.3 蛋白样品的制备与定量

切取对虾第二节(靠近头部)肌肉于研钵中,加入液氮研磨至粉末状。称取粉末样品 50 mg,分装于 1.5 mL EP 管中并添加 500 μL 的裂解液,震荡溶解后于 4°C 下孵育 2 h,每 30 min 混旋一次。孵育结束后于低温(4°C)离心机中 13 000 r/min 离心 1 h,撇开上面悬浮物和下层沉淀物,取中间澄清液,用 200 μL 的离心管分装,贮藏于 -20°C 备用。其中裂解液试验了两种配方,配方 I:8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、10 mmol/L Tris、2 mmol/L TBP,每 150 μL 裂解液加入 1 μL Bio-Lyte;配方 II:8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、65 mmol/L DTT、每 150 μL 裂解液加入 1 μL Bio-Lyte。

1.4 双向电泳

第一向等电聚焦 参照 IPGphor III 等电聚焦系统使用指南,等电聚焦程序设置两个对比,程序 I:50 V 主动水化 12 h,500 V 快速除盐 30 min,1 000 V 线性除盐 30 min,4 000 V 快速升压 30 min,8 000 V 快速升压 1.5 h,8 000 V 快速聚焦 65 000 V $\cdot$ h,500 V 保持 10 h;程序 II:50 V 主动水化 12 h,500 V 快速除盐 1 h,1 000 V 线性除盐 1 h,4 000 V 快速升压 30 min,8 000 V 快速升压 1.5 h,8 000 V 快速聚焦 80 000 V $\cdot$ h,500 V 保持 10 h。

胶条平衡 等电聚焦完毕后,将胶条置于含有 2% DTT 平衡缓冲液的水化槽中,于摇床平衡 13~14 min,取出胶条后放入含有 2.5% 碘乙酰胺平衡缓冲液的水化槽中,再平衡 13~14 min。

第二向 SDS-PAGE 电泳 采用 12.5% 的均匀 SDS-PAGE。将平衡后的 IPG 胶条移至凝胶的上方,0.5% 的琼脂糖封胶。上下槽加入电极缓冲液。起始电压为 100 V,45 min 后,加大电压至 300 V,直至溴酚蓝前沿。

1.5 染色

经典的考马斯亮蓝染色 ①固定(20% 三氯乙酸)1 h;②染色(0.1% 考马斯亮蓝 10% 冰乙酸 + 40% 乙醇溶液)2 h;③脱色(10% 冰乙酸 + 40% 乙醇溶液)2 $\times$ 30 min;④强化(1% 冰乙酸)过夜;⑤水洗 30 min。

硝酸银染色 参照牛屹东^[9]、郭尧君^[10]及 Bio-Rad 公司蛋白质银染试剂盒的操作手册进行,具体为:①固定(10% 冰乙酸 + 40% 乙醇)2 h 以上;②敏化(30% 乙醇 + 6.8% 乙酸钠 + 0.2% 硫代硫酸钠)30 min;③水洗 3 $\times$ 5 min;④0.25% 硝酸银银染 20 min;⑤水洗 2 $\times$ 1 min;⑥显色(2% 碳酸钠 + 0.8 mL/L 甲醛溶液)3 $\times$ 5 min;⑦终止(11.6 g/L EDTA)10 min;⑧水洗 3 $\times$ 5 min。

1.6 凝胶图像扫描与图谱分析

采用 GS800 高分辨专业扫描仪对银染凝胶进行灰度扫描,扫描方式为透射,图谱保存为 TIF 格式。采用 PDQuest 8.0 二维电泳图片分析软件对图谱进行分析。

2 结果

2.1 不同裂解液配方的电泳图谱

为完成好第一向等电聚焦,蛋白必须充分溶解,因此裂解液必须包含一定的组分以确保在进行第一向等电聚焦之前的充分溶解和变性,不同的裂解配方对蛋白质样品的影响也不同。本实验选用了 2 种不同的裂解液配方对蛋白的溶解效果进行了对比(如图 1)。裂解液 II 中的 DTT 取代了裂解液 I 中的 Tris 和 TBP,DTT 作为一种还原剂,促进了蛋白的溶解。

2.2 IPG 胶条长度对双向电泳结果的影响

先采用 7 cm 的 IPG 胶条进行双向电泳(图 2-a),但采用 7 cm 的 IPG 胶条效果不佳,图谱较为模糊,低分度蛋白很难被分辨,且蛋白的整体清

晰度都较不理想;之后采用了 17 cm 的 IPG 胶条进行双向电泳(图 2-b)。

2.3 不同 IPG 胶条 pH 范围的双电泳图谱

首先采用 pH 3~10 的 IPG 胶条进行双向电

泳(图 3-a)。可以看出,pH 3~10 的胶条分离效果不佳,尤其是在碱性段,蛋白点数较少且水平拖尾现象严重;然后分别选用 pH 5~8 和 pH 4~7 的 IPG 胶条进行了对比实验(图 3-b 和 3-c)。

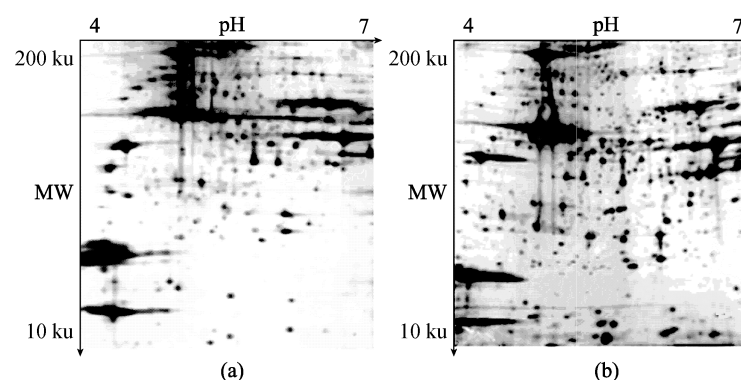


图 1 不同裂解液配方提取的对虾肌肉蛋白质 2-DE 图谱

17 cm,pH 4~7,银染;(a)配方 I;(b)配方 II。

Fig. 1 The 2-DE map of shrimp protein extracted by different lysis buffer

17 cm,pH 4~7,silver stain;(a)lysis buffer I;(b)lysis buffer II.

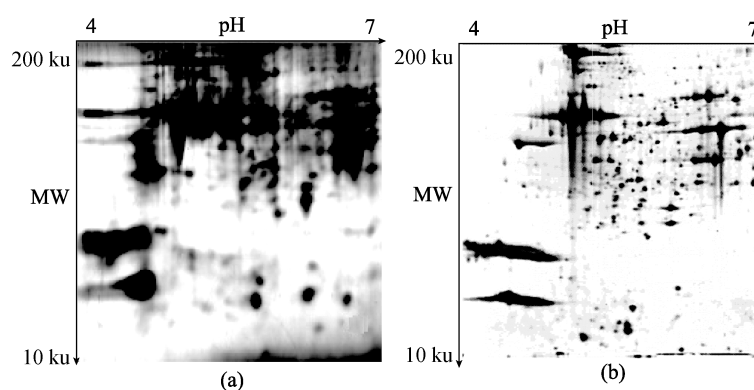


图 2 不同 IPG 胶条长度的对虾肌肉蛋白质 2-DE 图谱

17 cm,pH 4~7,银染;(a)7 cm;(b)17 cm。

Fig. 2 The 2-DE map of shrimp protein extracted by different length of IPG strips

17 cm,pH 4~7,silver stain;(a)7 cm;(b)17 cm.

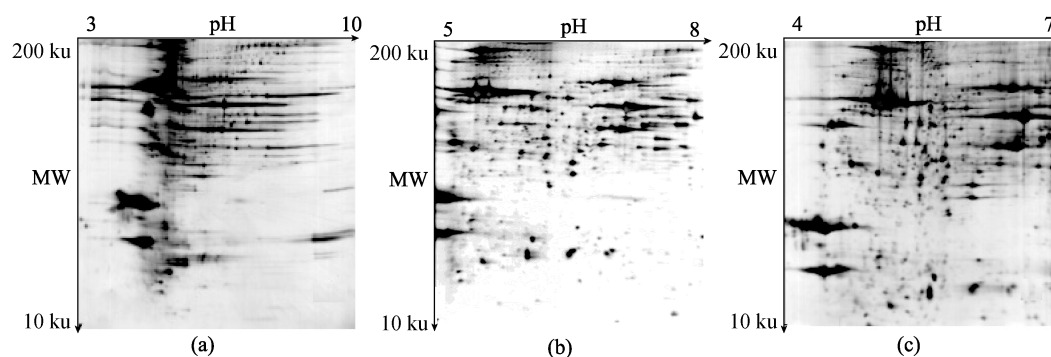


图 3 不同 pH 胶条的对虾肌肉蛋白质 2-DE 图谱

17 cm,银染;(a)pH 3~10;(b)pH 5~8;(c)pH 4~7。

Fig. 3 The 2-DE map of shrimp protein from different pH IPG strips

17 cm,silver stain;(a)pH 3~10;(b)pH 5~8;(c)pH 4~7.

2.4 不同水化方式的双向电泳结果比较

采用被动溶胀和主动溶胀对中国明对虾肌肉蛋白进行了分析(图 4),2-DE 图谱显示采用主动

溶胀,图的整体清晰度有了较好的改善,且部分区域的蛋白横纹现象减少。

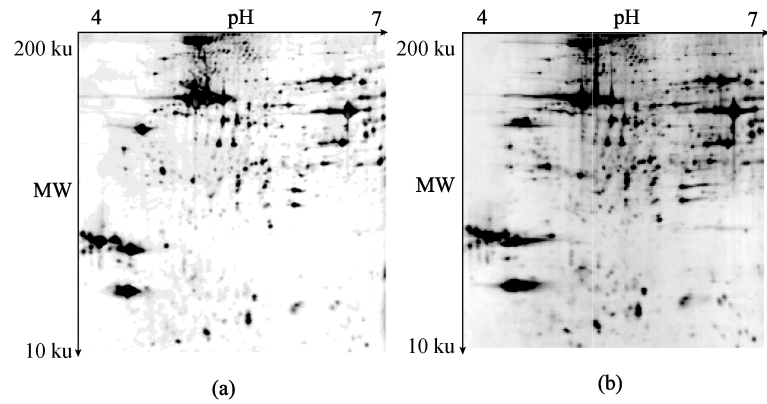


图 4 不同水化方式的中国明对虾肌肉蛋白质 2-DE 图谱
17 cm,银染; (a)主动; (b)被动。
Fig. 4 The 2-DE map of shrimp protein from different ways of hydration
17 cm, silver stain; (a) active; (b) passive.

2.5 不同等电聚焦程序的双向电泳结果比较

实验中对等电聚焦的除盐时间、聚焦电压及聚焦时间进行了调整,通过对比实验,发现按照等电聚焦程序 I,2-DE 图谱(图 5-a)中的蛋白点存

在横向拖尾现象,而程序 II 适当延长了除盐时间和等电聚焦时间,所得的 2-DE 图谱(图 5-b)中的蛋白质点聚焦相对更完全,横向拖尾的现象相对较少,蛋白点相对清晰。

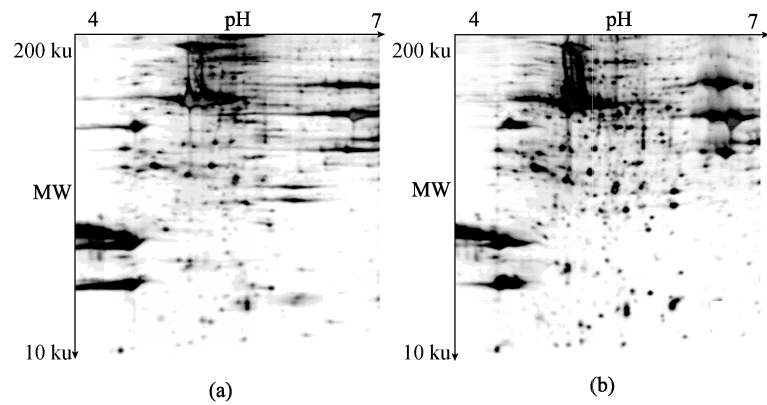


图 5 不同等电聚焦程序的对虾肌肉蛋白质 2-DE 图谱
17 cm,pH 4~7,银染; (a)程序 I; (b)程序 II。
Fig. 5 The 2-DE map of shrimp protein from different IEF formula
17 cm,pH 4~7, silver stain; (a) formula I; (b) formula II.

2.6 不同上样量的电泳图谱

实验对三个不同的上样量条件下的电泳情况进行了比较,结果发现较高的上样量(图 6-c)导致部分横条纹加重,部分蛋白出现堆积情况。特别是对于银染而言,上样量过大,使得染色过程更不易控制;过低上样量,使得部分低分度蛋白消失(图 6-a)。本研究发现,对于 17 cm 胶,120 μ g 上样量(图 6-b)条

件下的电泳图谱相对清晰,蛋白点的分辨率较高。

2.7 盐桥对中国明对虾双向电泳图谱的影响

考虑到中国明对虾肌肉组织中含有无机盐,因此加入了盐桥。与没加盐桥的 2-DE 图谱进行了对比(图 7)。由于盐桥的搭建(图 7-b),图谱上的部分蛋白点的清晰度有所提高,部分横条纹减少,聚焦效果更好。

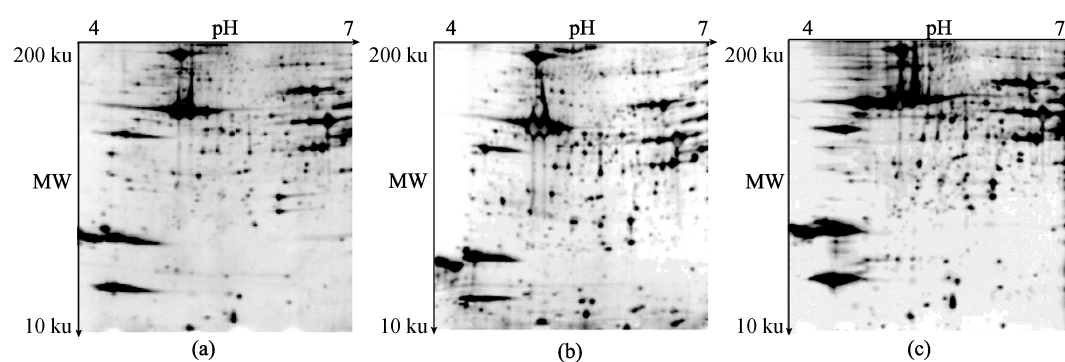


图 6 不同上样量的对虾肌肉蛋白质 2-DE 图谱

17 cm, pH 4~7, 银染; (a) 100 μg ; (b) 120 μg ; (c) 150 μg 。

Fig. 6 The 2-DE map of shrimp protein from different loading quantities

17 cm, pH 4~7, silver stain; (a) 100 μg ; (b) 120 μg ; (c) 150 μg 。

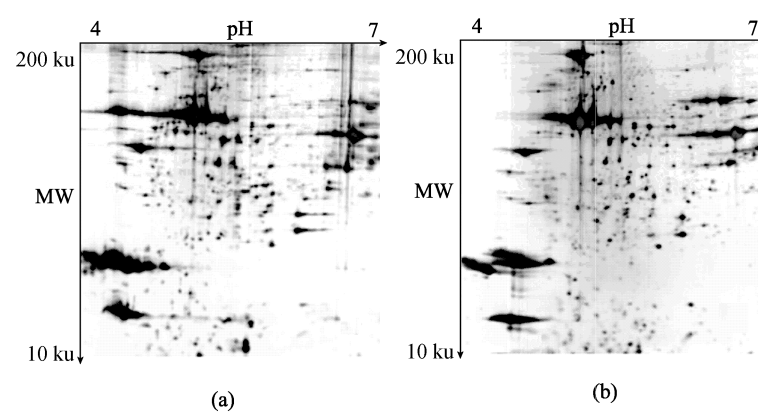


图 7 盐桥搭建前后的对虾肌肉蛋白质 2-DE 图谱

17 cm, pH 4~7, 银染; (a) 无盐桥; (b) 盐桥。

Fig. 7 The 2-DE map of shrimp protein with or without salt bridge

17 cm, pH 4~7, silver stain; (a) without salt bridge; (b) with salt bridge.

2.8 不同染色方法的双向电泳结果比较

银染和考染是双向电泳技术中普遍使用的两

种方法。图 8-a 为考马斯亮蓝染色, 上样量 600 μg ; 图 8-b 为硝酸银染色, 上样量 120 μg 。经过

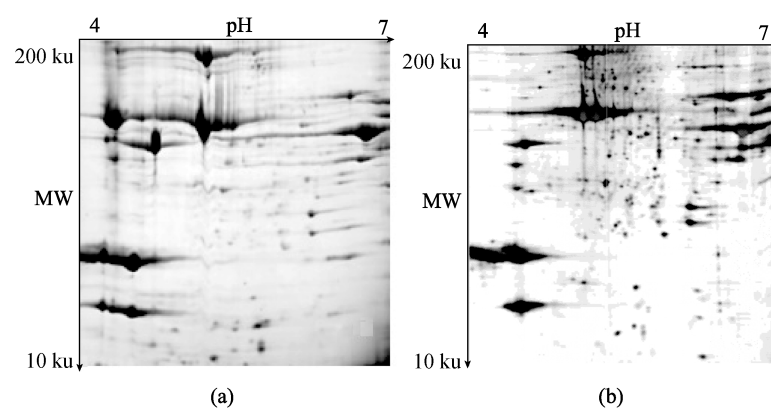


图 8 不同染色方法的 2-DE 图谱比较

17 cm, pH 4~7; (a) 考马斯亮蓝染色; (b) 硝酸银染色。

Fig. 8 2-DE map from Coomassie blue and silver stain

17 cm, pH 4~7; (a) coomassie blue stain; (b) silver stain.

图象扫描和分析,考染的 2-DE 图谱中检测到约 100 个蛋白点,而在银染图谱中可以检测到 500 个左右蛋白点。可以看出,银染的灵敏度明显高于考染。

2.9 不同二向胶浓度的双向电泳结果比较

为了选择适合中国明对虾肌肉蛋白的 SDS-PAGE 胶浓度以达到良好的分离效果,本实验对

10%、12.5% 和 15% 三种浓度 SDS-PAGE 胶的分离效果进行了对比(图 9);10% 浓度的二向胶 2-DE 图谱中蛋白点大部分位于图谱的中下部;15% 的二向胶 2-DE 图谱中蛋白点大部分位于图谱的中上部,分离效果均不佳;而 12.5% 的二向胶 2-DE 图谱中蛋白点分布较为均匀。

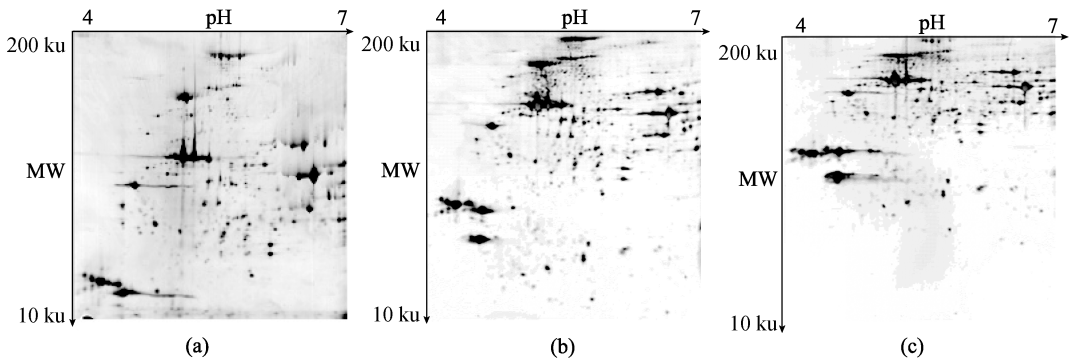


图 9 不同浓度胶的 2-DE 图谱比较
17 cm, pH 4 ~ 7; (a) 10%; (b) 12.5%; (c) 15%。
Fig. 9 The 2-DE map of shrimp protein from different density of gel
17 cm, pH 4 ~ 7; (a) 10%; (b) 12.5%; (c) 15%.

2.10 三块胶的重复性比较

对相同条件下同一样品的进行了三次双向电泳后,得到的 2-DE 图谱如图 10 所示。通过软件

分析发现,三块胶上分别检测到 778、805 和 785 个蛋白点。三张图谱中蛋白点的匹配率达 74%,相关系数达 0.874。

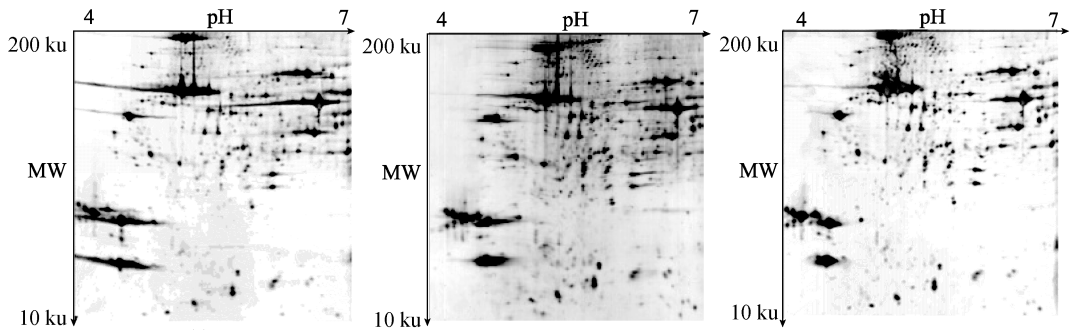


图 10 同一蛋白样品三块胶的重复性比较
17 cm, pH 4 ~ 7, 银染。
Fig. 10 The reproducibility of three 2-DE gels in same sample
17 cm, pH 4 ~ 7, silver staining.

3 讨论

3.1 不同裂解液配方的比较分析

蛋白样品制备是双向电泳操作的第一步,也是获得高分辨率和高重复性凝胶图谱的关键步骤^[11]。不同配方的裂解液对蛋白质的溶解和抽

提效果存在显著差异^[12]。在肌肉蛋白质提取方面应用较为广泛的裂解液配方主要成分包括尿素、DTT、CHAPS、硫脲和两性电解质(Bio-Lyte)等^[13-14]。本研究发现:裂解液 II 的蛋白得率高于裂解液 I。这可能是由于尿素和硫脲联用,破坏了蛋白分子间形成的氢键,从而防止了由氢键引

起的蛋白质聚集及蛋白迁移中二级结构的形成。同时离子去污剂 CHAPS 可溶解膜蛋白,从而解除蛋白与蛋白间的相互作用,增强蛋白的溶解^[15]。加入低浓度的两性电解质(Bio-Lyte),可以通过电荷与电荷之间的相互作用减少蛋白聚合,从而增强其溶解性。此外,还原剂 DTT 能帮助断裂蛋白质的二硫键,使待分析的蛋白分离成为单一的蛋白亚基,处于一种还原状态,使变性的蛋白质展开更完全,溶解更彻底。

3.2 IPG 胶条长度的比较分析

实验初期首先使用了较小长度(7 cm)的胶条分析,从 2-DE 图谱中可以看出由于长度限制,等电聚焦时蛋白分离效果不太理想,同时 SDS-PAGE 时蛋白分离效果也不好,因此在后续研究中选用较长长度的 IPG 胶条(17 cm),蛋白分辨率显著提高,图谱清晰度较好。

3.3 不同 IPG 胶条 pH 范围的选择

不同 pH 范围的胶条的选择也是有效分离蛋白质的关键^[16]。实验初期首先使用了宽范围(pH 3~10)的 IPG 胶条分析蛋白总体情况,从 2-DE 图谱中可以看出对虾肌肉蛋白质等电点主要集中在酸性端;之后使用了 pH 5~8 和 pH 4~7 的 IPG 胶条,发现 pH 4~7 的胶条跑出的图谱效果更佳,pH 3~10 和 pH 5~8 部分被掩盖的低分度蛋白点出现^[17]。因此,在后续的研究中选用 pH 4~7 的 IPG 胶条。

3.4 不同水化方式的选择

水化方式分为主动溶胀和被动溶胀。主动溶胀,是胶条在溶胀过程中加上一个非常低的电压,在电流的作用下,蛋白质(尤其是大分子蛋白)可主动进入凝胶条。而被动溶胀是蛋白仅靠被动吸收作用进入胶条。主动溶胀效果更佳,可能是胶条通过主动溶胀作用,蛋白在电流作用下与胶条的相互作用更加充分。

3.5 不同等电聚焦程序的选择

在第一向时等电聚焦(IEF)对目标蛋白混合物进行分离,以保证在第二向电泳中尽可能多地识别蛋白质,而 IEF 过程中除盐时间、聚焦电压和聚焦时间是主要影响因素。对虾肌肉中含有微量无机盐成分,会影响到蛋白质的分离和聚焦电压的上升。实验中适当延长了除盐时间和等电聚焦时间,提高了聚焦电压,蛋白分离效果和清晰度得到了一定的改善。

3.6 不同上样量的选择

胶条的蛋白上样量是决定双向电泳图谱蛋白点数和图谱质量的一个重要因素。上样量过大,虽有利于低丰度蛋白质的检测,但会影响等电聚焦,使蛋白点水平拖尾,且引起双向电泳图谱的畸变,而且银染染色时高丰度蛋白会掩盖其周围的一些蛋白点;上样量过小,虽然可以得到较为清晰的图谱,但是一些丰度相对低的蛋白不能被检测,总的蛋白点数偏少,可能会错过许多有研究价值的蛋白^[18]。经实验发现:上样量为 120 μg 的电泳图谱较好。

3.7 加盐桥与不加盐桥的比较分析

蛋白质提取液中盐离子会负载电流,干扰蛋白质的等电聚焦,导致 IEF 聚焦失败。因此,必须排除样品提取和溶解过程中盐离子、糖分、核酸类小分子的干扰,否则 IEF 电压很难达到理想的数值。IEF 时使用盐桥可以吸收盐离子和其他一些样品中的杂质,聚焦效果较好,故选择搭建盐桥。

3.8 不同染色方法的比较分析

银染相对于考染而言有较高的灵敏度,本实验考察了两种染色方法对图谱结果的影响。考马斯亮蓝染色虽在蛋白点质谱鉴定工作中具有一定的优势,但是为了检测出更多的蛋白点,方便蛋白质组学的比较分析,用于分析的染色方法主要采用了银染的染色方法。

3.9 不同二向胶浓度的比较分析

双向电泳中第二向 SDS-PAGE 很重要的一个因素是胶的浓度。对于不同胶的浓度蛋白进行电泳时遇到的阻力不同:浓度太大时,蛋白电泳遇到的阻力更大,因此不同蛋白之间更难分开;浓度太小时,蛋白电泳遇到的阻力更小,不同蛋白之间更易分开,但同时导致部分蛋白点跑出胶面,因此选择胶的浓度要适中。

3.10 三块胶的重复性比较分析

2-DE 图谱的重复性和稳定性是双向电泳技术存在的主要问题,也是其自身的局限性。重复性、稳定性好的蛋白质 2-DE 分离技术是下一步蛋白质组学分析结果可靠性的保障。实验结果表明,在本研究建立的双向电泳技术体系下,中国明对虾肌肉蛋白质 2-DE 图谱具有良好的重复性和稳定性,可满足后续实验分析的要求。

综上所述,本研究建立的中国明对虾肌肉组织蛋白质双向电泳技术体系为:以载体两性电

质 pH 梯度等电聚焦为第一向,12.5% 浓度垂直 SDS-PAGE 电泳为第二向,银染后扫描获取凝胶图像。其中,裂解液配方为 8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、65 mmol/L DTT、Bio-Lyte 按每 150 μ L 裂解液加入 1 μ L,使用 17 cm pH 4~7 的 IPG 胶条进行主动水化上样,上样量为 120 μ g,上样体积为 300 μ L 时,等电聚焦时间为 80 000 V $\cdot$ h,搭建盐桥并适当延长除盐时间。

参考文献:

- [1] Pennington S R, Wilkins M R, Hochstrasser D F, *et al.* Proteome analysis: from protein characterization to biological function [J]. Trends in Cell Biology, 1997, 7(4): 168–173.
- [2] 李学鹏, 励建荣, 于平, 等. 蛋白组学及其在食品科学研究中的应用 [J]. 中国粮油学报, 2010, 25(2): 141–149.
- [3] Martinez I, Slizyte R, Dauksas E. High resolution two-dimensional electrophoresis as a tool to differentiate wild from farmed cod (*Gadus morhua*) and to assess the protein composition of klipfish [J]. Food Chemistry, 2007, 102(2): 504–510.
- [4] 黄冰心, 蒋昊, 张继泉, 等. SDS-PAGE 与液质联用技术分离和鉴定中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 血浆蛋白 [J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(2): 208–213.
- [5] 秦兆宇, 刘师莲, 宋春华, 等. 中国对虾肝胰腺蛋白质组学双向电泳技术体系的建立 [J]. 生物医学工程研究, 2007, 26(1): 80–83.
- [6] 田美, 申欣, 孟学平, 等. 海水养殖凡纳滨对虾肌肉组织蛋白质组学研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(2): 760–762.
- [7] 项秀平, 韩剑众. 虾类蛋白质的双向电泳比较研究 [J]. 浙江农业学报, 2011, 23(1): 74–78.
- [8] Zhang J K, Li F H, Jiang H, *et al.* Proteomic analysis of differentially expressed proteins in lymphoid organ of *Fenneropenaeus chinensis* response to *Vibrio anguillarum* stimulation [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(2): 186–194.
- [9] 牛屹东. 蛋白质双向电泳实验手册 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 29–31.
- [10] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 34–37.
- [11] Blackstock W P, Weir M P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins [J]. Trends in Biotechnology, 1999, 17(3): 121–127.
- [12] Lilley K S, Razzaq A, Dupree P. Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantization [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2002, 6(1): 46–50.
- [13] Herbert B. Advances in protein solubilisation for two dimensional electrophoresis [J]. Electrophoresis, 1999, 20(4–5): 660–663.
- [14] Rabilloud T, Adessi C, Lunardi J, *et al.* Improvement of the solubilisation of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. Electrophoresis, 1997, 18(3–4): 307–316.
- [15] 钱小红, 贺福初. 蛋白质组学: 理论与方法 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 48–57.
- [16] Ong S E, Pandey A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics [J]. Biomolecular Engineering, 2001, 18(5): 195–205.
- [17] Molloy M P, Herbert B R, Walsh B J, *et al.* Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis [J]. Electrophoresis, 1998, 19(5): 837–844.
- [18] Gorg A, Boguth G, Obermaier C, *et al.* Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-DALT): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems [J]. Electrophoresis, 1995, 16(7): 1079–1086.

Establishment of two-dimensional electrophoresis(2-DE) technique in muscle proteome of *Fenneropenaeus chinensis*

LIU Zhiyuan¹, LI Jianrong^{2*}, LI Xuepeng², LI Tingting³, WANG Yanbo¹,
HUANG He⁴, CHEN Huajian⁵, LU Weike⁶

(1. College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China;

2. College of Chemistry, Chemical Engineering and Food Safety, Bohai University, Jinzhou 121013, China;

3. College of Life Science, Dalian Nationality University, Dalian 116600, China;

4. College of Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

5. Zhanjiang Guolian Aquatic Products Co., Ltd, Zhanjiang 524022, China;

6. Hangzhou Biotest Biotech Co., Ltd, Hangzhou 311121, China)

Abstract: In order to use two-dimensional electrophoresis(2-DE) analysis in the muscle proteins of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*), its muscle proteins were separated using immobilized pH gradient 2-DE after dissolving. By optimizing different extraction methods, pH of IPG gel strips and its length, isoelectric focusing programs, and loading amount, etc, the proteins were successfully extracted from Chinese shrimp muscle and were separated by 2-DE. After silver staining or Coomassie brilliant blue staining, PDQuest image analysis software was applied to analyze the 2-DE images. The results showed that most of shrimp muscle protein isoelectric points were between 4 and 7. The 2-DE related techniques was constructed and optimized in muscle proteome of Chinese shrimp by comparative tests on different extraction methods, IPG gel strips, isoelectric focusing programs, salt bridge, and sample volume, etc. The results showed that the resolution and reproducibility of 2-DE profiles were significantly improved by adding thiourea, CHAPS and DTT in lysis buffer, active rehydrating of 17 cm (pH 4 – 7) IPG gel strips, loading the sample 120 μ g, prolonging the time of desalting, increasing the voltage and power of isoelectric focusing, employing the salt bridge, preparing 12.5% SDS-PAGE gel, and dyeing the gels by the silver staining. It shows that the repeatability and stability are good enough.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; muscle protein; two-dimensional electrophoresis; proteomics

Corresponding author: LI Jianrong. E-mail: lijr6491@yahoo.com.cn